

# Gàmetes artificials: Diferenciació *in vitro* de gàmetes a partir de iPSCs

Noemi Vita García

Grau en Genètica. Universitat Autònoma de Barcelona



## Introducció

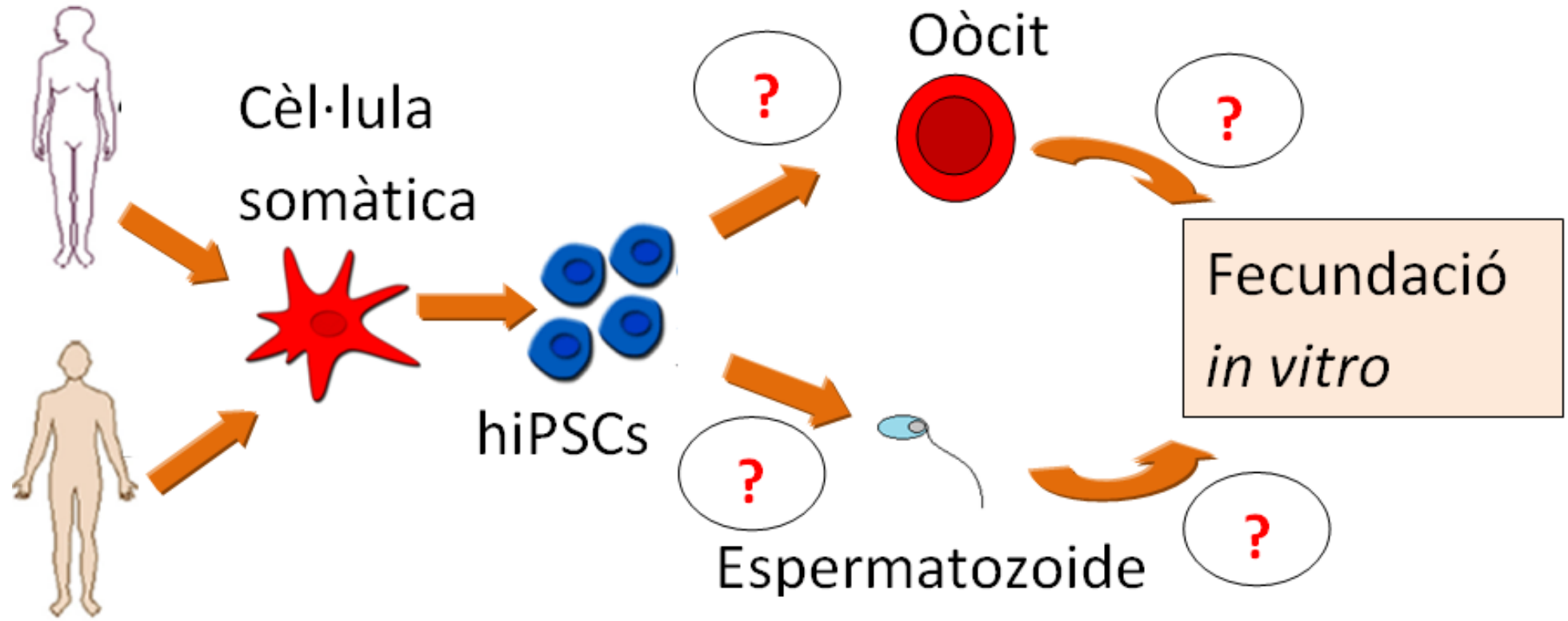
Actualment un 14% de les parelles pateixen infertilitat. El coneixement sobre la diferenciació de la línia germinal és escàs degut a la inaccessibilitat durant el desenvolupament fetal i, per aquesta raó, molts cops la donació de gàmetes es presenta com a única possibilitat per aconseguir que aquestes parelles tinguin descendència.

Recentment l'obtenció de cèl·lules mare de pluripotència induïda en humans (hiPSCs), a partir de la sobreexpressió de factors de transcripció essencials per la pluripotència en cèl·lules somàtiques, obre les portes a l'establiment de protocols que podrien permetre l'obtenció de gàmetes artificials del propi pacient amb una metodologia sense grans controvèrsies ètiques.

## Objectius

➤ Determinar les diferents estratègies per diferenciar, *in vitro*, gàmetes a partir de cèl·lules mare de pluripotència induïda (iPSCs). Proposar quina d'aquestes metodologies seria millor.

➤ Estat de la tècnica a partir de hiPSCs:



Esquema 1. Objectiu principal.

➤ Futurs reptes en aquest camp d'investigació.

## Metodologia

Revisió bibliogràfica:

➤ Cerca a *PubMed* a partir de les paraules clau: "gametogenesis in vitro", "in vitro differentiation germ cells", "hiPSC". Es limita la cerca als darrers 5 anys.

➤ Ampliació de la informació amb les referències que presenten els articles seleccionats a la cerca inicial.

➤ Redacció de la memòria i realització del pòster.

## Estratègies de diferenciació

### Condicions de cultiu

#### Co-cultius

Certes línies cel·lulars cultivades amb hiPSCs proporcionen els factors tròfics necessaris per la diferenciació germinal.

✗ Dificultat per determinar quin factor i/o de quina manera està implicat en la diferenciació, no permet una millor comprensió dels processos *in vivo*.

#### Factors moleculars

Proteïnes morfogenètiques òssies (BMPs)

➤ Promouen la diferenciació fins PGCs

BMPs → *Blimp1* → Programa somàtic

Esquema 1. Regulació de l'aturada del programa somàtic.

Àcid retinoic (RA)

➤ Indueix la meïosi

Testicle embrionari

*CYP26* → ↓ [RA] → *Stra8* → No inici de la meïosi

Ovari embrionari

*CYP26* → ↑ [RA] → *Stra8* → Inici de la meïosi

Esquema 2. Regulació de l'inici de la meïosi a les gònades. Modificat de Koubova J *et al.*, 2006.

### Sobreexpressió de gens

Manipulació de l'expressió de gens que regulen la diferenciació germinal per tal de promoure-la, concretament gens que codifiquen proteïnes d'unió al RNA.

#### Família gènica *DAZ*

Expressió específica de la línia germinal.

En humans formada per:

→ Gens autosòmics

- *DAZL* →

Implicat en la formació de PGCs i en l'inici de la meïosi

- *BOULE*

→ Cluster de gens *DAZ* al cromosoma Y

Implicats en els últims estadis de diferenciació i el desenvolupament de la línia germinal

#### Gen que codifica *VASA*

En humans: gen *DDX4*

- *VASA* →

Promou la formació de PGCs i induïx la progressió meïòtica

## Desenvolupament *in vivo* de la línia germinal en humans

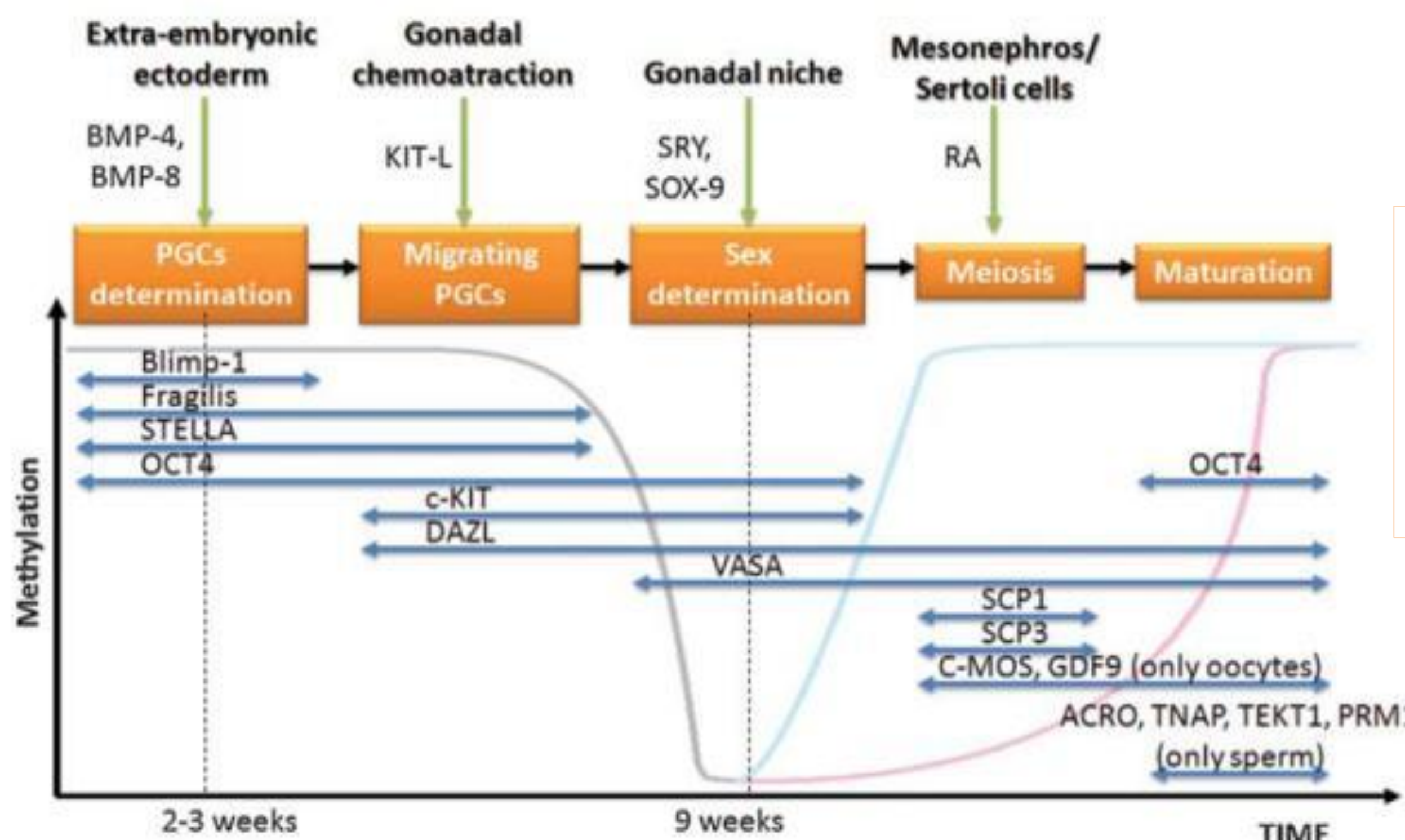


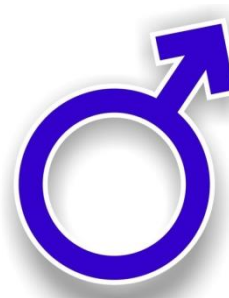
Fig.1. Representació esquemàtica dels diferents estadis de desenvolupament de la línia germinal humana i de la reprogramació epigenètica durant aquesta diferenciació. Les primeres cèl·lules germinals immadures s'anomenen cèl·lules germinals primordials (PGCs). Extret de de Medrano JV *et al.*, 2013.

## Determinació de l'estat de diferenciació

Tipus de marcador	Exemple	Estadi de diferenciació
Marcador de superfície	SSEA1 i c-KIT	Cèl·lules semblants a PGCs
	CD9+/CD49F++/CD90-	Cèl·lules semblants a espermatogonis
Sistema reporter	VASA-GFP	Cèl·lules semblants a PGCs
Marcador de procés meïòtic	SCP3 CENPA	Profase I (complex sinapteinemal) Meïosi (centròmer)
Marcador postmeïòtic	Acrosina	Cèl·lules postmeïòtiques
Gens imprintats	H19	De-metilació: Cèl·lules semblants a PGCs Metilatat: estadis més avançats de diferenciació

Taula 1. Resum dels diferents marcadors utilitzats per determinar l'estadi de diferenciació

## Estat de la tècnica



Referència	Cèl·lula d'origen	Factors addicionals	Cèl·lules derivades <i>in vitro</i>	Eficiència en l'obtenció de cèl·lules haploides	Avaluacions principals
Park TS <i>et al.</i> , 2009	Fibroblast XY	Cèl·lules gonadals fetals	PGCs	-----	Expressió (STELLA,VASA,Acrosina) <i>Imprinting</i> (H19,PEG1)
Panula S <i>et al.</i> , 2011	Fibroblast XY, XX	BMP4,7 i 8 Sobreexpressió família <i>DAZ</i>	Espermàtides	Aproximadament 1,5%	Expressió (VASA,Acrosina)
Eguizabal C <i>et al.</i> , 2011	Queratinòcits i sang del cordó XY, XX	RA, forskolina i CYP26	PGCs Espermàtides	0,4-2,3%	Expressió (VASA,SCP3,Acrosina) <i>Imprinting</i> (H19)
Medrano JV <i>et al.</i> , 2012	Fibroblast XY,XX	Sobreexpressió VASA/DAZL	Espermàtides	0,5-1%	Expressió(VASA,Acrosina) <i>Imprinting</i> (H19)
Easley CA <i>et al.</i> ,2012	Fibroblast XY	BMP4,7 i 8	Espermatogonis Espermatòcits Espermàtides	3,9%	Expressió (VASA,Acrosina) <i>Imprinting</i> (H19,IGF2)

Taula 2. Diferenciació de hiPSCs en la línia germinal masculina. Modificat de Botman O. *et al.*, 2014.



No s'ha aconseguit diferenciar cèl·lules semblants a oòcits ni a oogònies a partir de hiPSCs.

## Futurs reptes



## Conclusions

➤ Estratègies de diferenciació:

- Tant els factors incorporats al medi de cultiu com els gens sobreexpressats en les diferents estratègies es veuen implicats en diferents moments de la diferenciació germinal.
- En un mateix protocol podem trobar combinats diferents factors incorporats al medi de cultiu i/o gens sobreexpressats.
- En diferents protocols les eficiències es troben determinades a partir de tècniques diferents.

Dificulta la seva comparació

No es proposa cap estratègia com a millor

➤ Estat de la tècnica

- ✓ Diferenciació de hiPSCs fins cèl·lules semblants a espermàtides rodones.
- ✓ NO s'obtenen cèl·lules semblants a oòcits a partir de hiPSCs.

Cal superar els reptes comentats abans de dur aquestes tècniques a la clínica.

## Referències rellevants

- Medrano JV *et al.* Germ cell differentiation from pluripotent cells. *Semin Reprod Med.* 2013 Jan;31(1):14-23. Review.
- Koubova J *et al.* Retinoic acid regulates sex-specific timing of meiotic initiation in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006 Feb 21;103(8):2474-9.
- Park TS *et al.* Derivation of primordial germ cells from human embryonic and induced pluripotent stem cells is significantly improved by coculture with human fetal gonadal cells. *Stem Cells.* 2009 Apr;27(4):783-95.
- Panula S *et al.* Human germ cell differentiation from fetal- and adult-derived induced pluripotent stem cells. *Hum Mol Genet.* 2011 Feb 15;20(4):752-62.
- Eguizabal C *et al.* Complete meiosis from human induced pluripotent stem cells. *Stem Cells.* 2011 Aug;29(8):1186-95.
- Medrano JV *et al.* Divergent RNA-binding proteins, DAZL and VASA, induce meiotic progression in human germ cells derived in vitro. *Stem Cells.* 2012 Mar;30(3):441-51.
- Easley CA *et al.* Direct differentiation of human pluripotent stem cells into haploid spermatogenic cells. *Cell Rep.* 2012 Sep 27;2(3):440-6.
- Botman O, Wyns C. Induced pluripotent stem cell potential in medicine, specifically focused on reproductive medicine. *Front Surg.* 2014 Mar 24;1:5. Review.